

NASBA Amplification キット

注：この使用説明書をよく読んでから使用して下さい。

【はじめに】

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) 法は、主としてRNAの鋳型に対して一本鎖のRNA断片をin vitroで特異的に直接増幅する方法です。

NASBA法はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)と同様に酵素を用いて核酸を増幅する方法ですが、PCRと異なりその増幅反応に温度サイクルを必要としません。さらに、RT-PCR法にてRNAを増幅する場合、操作が煩雑で時間も要していましたが、NASBA法を用いれば1回の反応で済み、時間も2時間以内で終了します。

NASBA Amplification キットは、RNA Polymerase反応を利用して、RNAを特異的に増幅する研究用試薬です。

【特徴】

- 1) RNAを標的とし、高い効率でアンチセンスRNAとして増幅します。
- 2) 2本鎖DNAは鋳型にならないので、RNA特異的増幅が可能です。
- 3) T7 RNA Polymeraseを含む増幅反応を定温度で行うため、特別な装置は不要です。

【試薬構成】

- | | |
|---------------------|--|
| 1) NASBA試薬 | dNTPs, NTPs |
| 2) NASBA溶解液 | トリス緩衝液 |
| 3) NASBA酵素試薬 | AMV-RT, RNaseH, T7 RNA polymerase |
| 4) NASBAコントロールプライマー | ヒト β -actin primer
(forward primer及びreverse primer) |

【測定原理】

NASBAは標的RNAに特異的な2種類のプライマー及び3種類の酵素(AMV-RT, RNaseH, T7 RNA polymerase)を用いた遺伝子増幅法です。

標的RNA(センス)に相補的なP1プライマー(P1)は5'側にT7 RNA polymeraseのプロモーター配列が付加されています。P2プライマー(P2)は、P1伸長して生じたアンチセンスcDNA鎖に相補的なセンス配列を有しています。

P1を標的RNA(センス)にアニールさせ、続くAMV reverse transcriptase(AMV-RT)によるP1からの伸長反応(アンチセンス cDNAの合成)から始まります。形成されたRNA-DNAハイブリッド中の標的RNAはRNaseHにより分解され、cDNA(アンチセンス)は1本鎖となります。この1本鎖になったcDNAにP2がアニールします。cDNA(アンチセンス)にアニールしたP2はAMV-RTのDNA polymerase活性により伸長され、T7 RNA polymeraseのプロモーターを含む2本鎖DNAとなります。このプロモーター配列をT7 RNA polymeraseが認識して、P2の5'-末端まで標的RNAに対するアンチセンス配列のRNAコピーを多数合成します。この時1本鎖のRNAは、RNaseHの基質にならないので分解されません。

新しく合成されたアンチセンスRNAを鋳型として、P2によるセンスcDNAの合成及びRNase Hによる RNA-DNAハイブリッドの分解が行われます。1本鎖になったcDNA(センス)の3'-末端にアニールしたP1はAMV-RTにより伸長され、T7プロモーター配列が、2本鎖となり、アンチセンス配列のRNAコピーを多数合成します。

このステップが一定温度で連続的に起こることにより、指数的にRNAが合成されます。この結果生じる主な増幅産物は、アンチセンスRNAです。

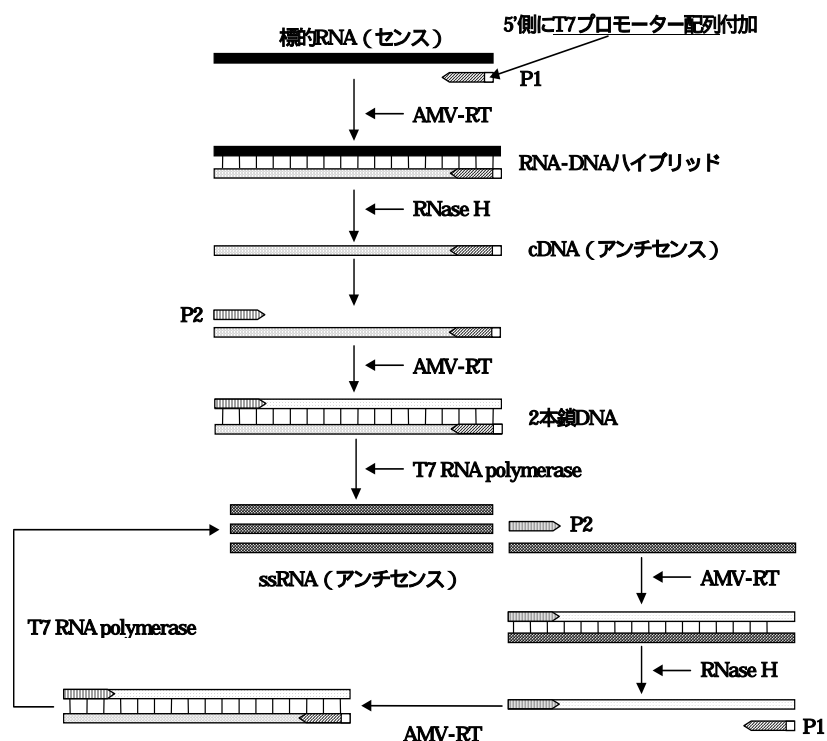


図 NASBA増幅原理

製造販売元

K 株式会社 カイノス

〒113-0033 東京都文京区本郷 2-38-18 ☎03(3816)4485

輸入先

Life Sciences inc.

【試薬調製法】

1. 準備が必要な試薬

プライマー

標的とするRNAに相補的な配列を含むプライマー1 (P1) 及びプライマー2 (P2) の2種類を準備してください。P1の5'側にT7プロモーター配列が含まれていることが必要です。

*T7プロモーター配列は、以下のとおりです。

5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG・・・・

RNase-free water

分子生物学グレードのものを準備してください。NASBA酵素試薬溶解時に使用します。

2. 試薬の調製法

NASBA反応溶液

NASBA試薬1本にNASBA溶解液1本を加え、直ちにvortexして充分溶解してください。溶解後、0.5 mLマイクロチューブに10 µLずつ分注してください。

注意：反応開始まで室温に保存してください。使用しないチューブは直ちに冷蔵あるいは凍結保存してください。調製後、4 保存遮光で1週間、-20 遮光保存で1ヶ月間使用できます。凍結・融解は2回まで反応に影響を与えません。

NASBAコントロールプライマー

そのまま使用してください。

反応液

NASBA反応溶液10 µLに、標的とするRNAに相補的な配列を含むプライマー1 (P1) 及びプライマー2 (P2) の2種類を各々0.4 µmol/Lに加え、軽くvortexし、混和してください。

*4 µmol/Lプライマー液の場合、1 µLずつ添加してください。

NASBAコントロールプライマーを使用する場合は、NASBA反応溶液10 µLに、1 µLを添加し、軽くvortexし、混和してください。

注意：調製後は、遠心せず振り落とす程度にし、反応開始まで室温にて保存してください。

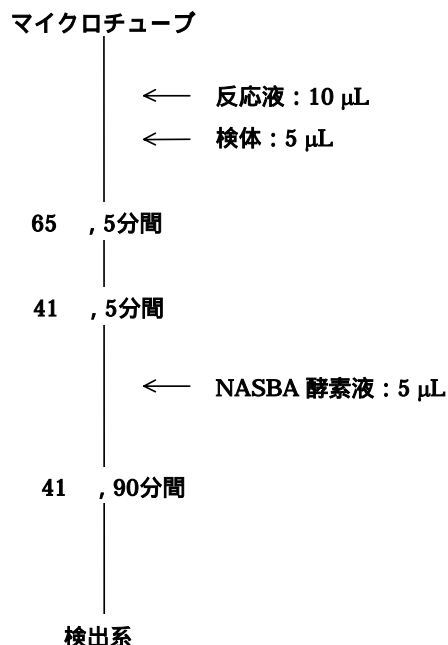
NASBA酵素液

NASBA酵素試薬1チューブに55 µLの精製水 (RNase-free water) を加え、10秒程度待ってから軽く叩く等して溶解・混和してください。

注意：vortex等による激しい溶解・混和は酵素が失活してしまうので、行わないでください。調製後は、室温にて保存してください。

【操作方法】

- 1) 検体は使用時まで氷冷してください。また、クリーンベンチ内にヒートブロックを設置し、温度65 及び41 に設定してください。
- 2) 反応液10 µLに検体を5 µLずつ添加し、vortexにて軽く混合し、液を落としてください。
- 3) ヒートブロックにて65 で5分間加温してください。加温後、ヒートブロックにて41 で5分間加温してください。
注意：65 で5分間加温の操作は、増幅効率の高い項目では省略可能です。
- 4) NASBA酵素液をマイクロチューブに5 µLずつ添加し、手早く穏やかに混和した後、ヒートブロックにて41 で90分間加温してください。
注意：増幅効率を低下させる温度低下を招かないよう、NASBA酵素液添加後、チューブ底を軽く叩く又はピペットチップの先端を回す等、穏やかかつ速やかな混和操作が重要です。
NASBA酵素液添加後の最初の5分間はNASBA初期反応に重要ですので、溶液をはじくように強く叩く又は遠心など温度低下を招く操作は控えてください。
- 5) 反応終了後、検出操作に移行するまで-20 以下で保存してください。



【操作上又は取扱い上の注意】

1. RNase等による分解防止のため、検体RNA、試薬の取扱い及びNASBA操作時には、必ずグローブを着用してください。
2. 試薬の保存にあたってはコンタミネーション防止に留意してください。
3. NASBA産物は、-20 保存で数週間保存可能ですが、長期保存を行う場合は、ディープフリーザー (-70 以下) にて保存してください。
4. 各試薬は、全て-20 で遮光保存してください。
5. ラベル記載の有効期間内に使用してください。
6. ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。
7. RNA濃度が高すぎるとNASBA Amplification キット反応を阻害することがあります。検体は、0.1 µg前後 (total RNA) をお奨めします。
8. NASBAコントロールプライマーは、ヒト -actinに特異的なプライマーセットです。NASBA Amplification キットの試薬調製及び操作の確認用として、ヒト検体 (total RNA) に対して使用してください。
9. 同一プライマーを用いる場合には、以下の試薬調製法をお奨めします。
プライマー溶液
NASBA溶解液100 µLにP1及びP2を各々0.4 µmol/L添加し、調製してください。
*10 µmol/Lプライマー液の場合、4 µLずつ添加してください。
反応液
NASBA試薬1本にプライマー溶液を全量加え、直ちにvortexして充分溶解してください。
10. 本試薬は研究用にもみ使用してください。

【貯法・有効期間】

貯 法：-20 で遮光保存
有効期間：製造後1年間

【包装単位】

管理コード	構成試薬	包 装
BI-0200	NASBA試薬 NASBA溶解液 NASBA酵素試薬 NASBAコントロールプライマー	100 µL用 × 5 120 µL × 5 55 µL用 × 5 6 µL × 1

【主要文献及び文献請求先】

1. 主要文献
 - 1) J. Compton : Nature 350 : 91-92 (1991)
 - 2) 川口竜二, 小林 優 : 臨床検査41,13 : 1798-1801 (1997)
 - 3) 宝田 裕, 近藤元宏 : 遺伝子医学2 : 105-110 (1998)
2. 文献請求先
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03(3816)4480
株式会社カイノス 學術部